

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

PCT/FR 00/01259

REC'D 26 MAY 2000

WIPO PCT

19996493

BREVET D'INVENTION

FROO/01259

4

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 18 MAI 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télecopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales.

- Réserve à l'INP

DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT DATE DE DÉPÔT		10.5.99 99 05943 - <i>fr</i> 10 MAI 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET REGIMBEAU 26, Avenue Kléber 75116 PARIS			
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle		<input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen		 demande initiale → brevet d'invention			
Établissement du rapport de recherche		<input type="checkbox"/> différencié <input checked="" type="checkbox"/> immédiat		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone 237796 D18162 PM 01 45 00 92 02			
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance		<input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		date			
Titre de l'invention (200 caractères maximum)							
Conjugué acide nucléique-anticorps pour délivrer un acide nucléique étranger dans les cellules							
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN				code APE-NAF			
Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)							
Forme juridique ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTÈRE SCIENTIFIQUE ET TECHNO...							
Nationalité (s) Française							
Adresse (s) complète (s) 3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16 Pays FR							
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>							
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée							
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission							
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande							
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date							
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) <i>JF MLLS</i>						SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI <i>M</i>	



DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 05 943

TITRE DE L'INVENTION : **Conjugué acide nucléique-anticorps pour délivrer un acide nucléique étranger dans les cellules**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**HIRSCH François
20, rue Victor Carmignac
94110 ARCUÉIL
FR**

**DURRBACH Antoine
1, rue des Champs
94170 LE PERREUX, FR**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

10 mai 1999

CABINET REGIMBEAU

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.+ (revendications modifiées)».

BEST AVAILABLE COPY

ORIGINAL

1

La thérapie génique a pour objet de corriger un défaut génétique par intervention sur l'ADN. Elle peut être réalisée selon deux approches distinctes : soit comme une correction du génotype par réparation de l'anomalie génique, soit par correction du phénotype par greffe d'une 5 version normale du gène permettant ainsi de suppléer le gène défectueux toujours présent. La thérapie génique s'applique aussi bien au traitement des maladies génétiques constitutionnelles que acquises. Ainsi, un certains nombres de maladies génétiques constitutionnelles sont candidates à une thérapie génique ; on peut citer, entre autres, la 10 mucoviscidose, la myopathie de Duchenne ou le déficit en adénosine désaminase (Cournoyer *et al.*, 1991, "Gene transfer of adenosine deaminase into primitive human hematopoietic progenitor cells", Human Gene Therapie, 2 : 203). La thérapie génique s'applique aussi à la lutte contre les maladies acquises dont les maladies candidates sont les 15 cancers et les maladies infectieuses et virales (SIDA, hépatites).

Dans la thérapie des cancers, les premières expériences effectuées avec les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL : tumor infiltrating lymphocytes) ont démontré que des cellules pouvaient être armées avec des facteurs cytotoxiques (TNF, tumor necrosis factor) (Rosenberg *et al.* 20 1990, "Gene transfer into humans : immunotherapy of patients with advanced melanoma using infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction" N. Eng. J. Med. 323 :570-578) ou être dopées avec des cytokines ; ainsi Golumbek et ses collaborateurs ont obtenu un succès thérapeutique sur des cancers rénaux de souris 25 traités par des cellules produisant de l'interleukine 4 (Golumbek *et al.* 1991, Science 254 :713-716).

La thérapie génique effectuée sur les cellules somatiques d'un individu affecté d'un défaut génétique pose de multiples problèmes méthodologiques, le gène réparé ou greffé devant être exprimé 30 normalement de façon régulière, c'est-à-dire au bon endroit, au bon

moment et en quantité normale adaptée aux besoins ; la correction ou la greffe devant être indéfiniment stable.

Parmi les stratégies de transfert génique somatique *ex vivo* développées pour tenter de cibler spécifiquement et efficacement les cellules d'intérêt, il convient de citer : (i) les stratégies utilisant les méthodes physiques telles que la co-précipitation par le phosphate de calcium, l'électroporation, la micro-injection, la fusion de protoplastes, la biolistique ou les véhicules artificiels tels les liposomes et les ligands de récepteur par exemple ; (ii) et celles faisant appel aux vecteurs viraux (réetrovirus, adénovirus, AAV, HSV) (Ragot *et al.*, 1993 *Nature* 361 : 647-650). Parmi les stratégies de transfert génique somatique *in vivo* développées peuvent être citées les véhicules cellulaires ayant préalablement reçus le gène *ex vivo* (cellules souches hématopoïétiques, lymphocytes, hépatocytes, cellules endothéliales, cellules épithéliales), les vecteurs viraux, l'injection intra-musculaire d'ADN nu et les véhicules artificiels.

Une des difficultés actuelles de la thérapie génique porte sur le ciblage *in vivo* des cellules à modifier. Actuellement, seul un petit nombre d'approches virales ou synthétiques ont été développées ; elles exploitent essentiellement les interactions ligand-récepteur (Michael et Curiel, 1994, « Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway », *Gene Therapy* 1:223).

Différentes approches utilisant un vecteur viral ont ainsi été expérimentées. Une première approche a consisté à ponter via la streptavidine, des anticorps biotinylés dirigés contre une structure cellulaire cible à des anticorps également biotinylés dirigés contre les structures de l'enveloppe rétrovirale et donc associés à un rétrovirus (Roux *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :9079-9083). Une fois liés aux cellules, les vecteurs rétroviraux sont internalisés par endocytose et sont capables d'échapper au système lysosome-endosome par un mécanisme de transfert de l'endosome vers le cytoplasme,

évitant ainsi la dégradation de l'ADN transfecté et permettant l'entrée dudit ADN dans le noyau cellulaire. Cette approche a révélé une absence de spécificité du ciblage *in vivo* due à l'accrochage non spécifique des vecteurs rétroviraux à la surface cellulaire. Une deuxième 5 approche virale a été développée qui utilise des virus ectopiques modifiés pour porter une protéine-ligand d'enveloppe chimérique à leur surface (Kasahara *et al.* 1987 « Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system » J. Biol. Chem. 262 :4429). Enfin, il convient de citer l'approche développée par Neda *et* 10 *al.* (1991 « Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity » J. Biol. Chem. 266 : 14143).

Des approches synthétiques non virales ont également été expérimentées. Elles sont réalisées par la formation d'un complexe entre 15 un ligand capable de se lier à la surface de la cellule cible et avec l'ADN à transférer. Il convient de citer tout d'abord les approches utilisant les véhicules artificiels tels les liposomes recouverts d'anticorps (immunoliposomes); ce type d'approche ne s'est pas, à présent, avérée satisfaisante car les immunoliposomes présentent une activité non 20 spécifique vraisemblablement suite à l'accrochage non spécifique des liposomes aux membranes cellulaires. Il est également apparu que l'efficacité de transfert de gène contenu dans les liposomes reste modeste bien qu'il est supposé que la dégradation associée aux endosomes est évitée par l'utilisation des liposomes. Des approches 25 alternatives utilisant des composés qui retiennent l'aptitude à interagir spécifiquement avec des récepteurs cellulaires de surface ont été développées. En effet, différents récepteurs naturellement présents à la surface des cellules ont la propriété de s'internaliser dans la cellule après fixation sur leur ligand ; ainsi la transférine, dont le récepteur a 30 une répartition tissulaire ubiquitaire, a fait l'objet de nombreuses expériences (transférinfection) (Zenke *et al.*, 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.

USA, 87 :3655-3659). Une autre alternative a consisté à cibler des asialoglycoprotéines présentent à la surface des hépatocytes (Wu *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266 :14338-14342). Enfin une autre technique appelée « antifection » développée par l'un des inventeurs de la présente invention (Hirsch *et al.* « Antifection : a new method to targeted gene transfection » 1993, Transpl. Proc. 25 : 138) a été décrite ; cette technique consiste à préparer un vecteur anticorps-ADN qui est délivré à une population cellulaire sélectionnée (Brevet US 5 428 132).

Outre les problèmes de ciblage du vecteur, une autre difficulté à surmonter dans les expériences de thérapie génique se situe dans le transfert, à l'intérieur des cellules, de l'ADN à transfecter et de la protection de cet ADN contre les activités nucléasiques des compartiments cellulaires lysosomiaux afin d'obtenir une expression conséquente du transgène.

Différentes approches ont été développées pour répondre à ce problème ; une efficacité accrue de l'expression du transgène a ainsi pu être obtenue en utilisant des agents lysosomotropiques tels la chloroquine (Zenke *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :3655-3659 ; Luthman *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11 : 1295) ; de tels agents réduisent la destruction lysosomale de l'ADN en augmentant le pH des endosomes et en inhibant le transfert du matériel internalisé vers les lysosomes. Une autre approche consiste à utiliser des domaines protéiques ayant une activité de translocation cellulaire. La propriété de ces domaines est mise à profit pour faciliter l'échappement des acides nucléiques transfectés hors des vésicules endosomiales afin d'augmenter l'efficacité du transfert d'acide nucléique vers le noyau (Fominaya et Wels, 1995, J. Biol. Chem. 271 :10560). La demande internationale de brevet WO 94/04696 décrit un système de transfert d'acide nucléique composé d'un domaine de translocation provenant de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* ; l'efficacité de transfection et la spécificité d'un tel système de transfert apparaît très bas. Une autre

demande internationale de brevet WO 96/13599 décrit également un système de transfert d'acide nucléique composé d'une protéine monomérique recombinante comportant différents domaines fonctionnels dont un domaine de translocation dérivés de toxines, de 5 préférence bactériennes, telle que l'exotoxine A.

Les stratégies de thérapie génique préalablement évoquées nécessitent des préparations laborieuses ou du matériel sophistiqué et peuvent présenter un certain risque biologique. Il existe à l'heure actuelle un besoin de développer un système de transfert simple et 10 efficace d'acides nucléiques qui permette d'introduire spécifiquement dans les cellules cibles des acides nucléiques exprimés efficacement. A ce titre, la technique d'antifection (brevet US 5 428 132), basée sur l'utilisation d'anticorps pour cibler des séquences d'ADN d'intérêt dans des cellules cibles, est extrêmement prometteuse car les anticorps 15 constituent un outil extrêmement efficace pour diriger le vecteur de transfert vers un type cellulaire particulier du fait de la grande affinité et de la grande spécificité des anticorps; de plus la multitude d'anticorps monoclonaux et polyclonaux disponibles dirigés contre les nombreuses structures cellulaires tumorales ou normales donne à cette technologie 20 un réel intérêt. Néanmoins la technique d'antifection décrite dans le brevet US 5 428 132 bien qu'elle permette un ciblage efficace, ne permet pas d'obtenir une expression conséquente du transgène transfecté.

C'est donc l'objet de la présente invention d'améliorer le taux 25 d'expression du transgène transfecté dans les cellules cibles en utilisant la technologie d'antifection. Ces améliorations portent sur l'adjonction d'un domaine de translocation au complexe ADN-anticorps et/ou à l'utilisation de protéine de liaison à l'ADN pour coupler de manière non covalente l'ADN au complexe. Ces améliorations permettent de manière spectaculaire et inattendue d'augmenter de 2 à 10 fois le taux 30 d'expression du transgène dans la cellule cible.

La présente invention concerne donc un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un domaine de translocation et un anticorps spécifique d'un antigène de surface de ladite cellule, tel que ledit conjugué est transfété efficacement dans ladite cellule.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention (A), le conjugué selon l'invention est caractérisé en ce que lesdits molécule d'acide nucléique, domaine de translocation et anticorps sont conjugués au moyen d'au moins un agent de pontage.

Selon un deuxième mode de réalisation (B), l'invention concerne un conjugué caractérisé en ce qu'il comprend en outre une molécule de liaison aux acides nucléiques, tel que ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique.

Selon un autre aspect (C), l'invention concerne un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et une molécule de liaison aux acides nucléiques tel que ledit conjugué est transfété efficacement dans ladite cellule ; ce conjugué se caractérise en ce que ladite molécule d'acide nucléique, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique.

L'agent de pontage permet de lier de manière chimique (covalente), électrostatique, non-covalente tout ou partie des composants du conjugué. Parmi les agents de pontage susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, il convient de citer la benzoquinone, la

carbodiimide, la dimaléimide, l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB), le N-succinimidyl-S-acétyl-thioacétate (SATA), le N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), le 6-hydrazinonicotimide (HYNIC), la biotine; la benzoquinone et la biotine étant les agents de coupage préféremment utilisés. Par "molécule de type avidine", on entend désigner toutes molécules se liant avec une forte affinité à la biotine, et de préférence la molécule tétravalente d'avidine, la streptavidine, la neutravidine.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le premier mode de réalisation (A) est caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la benzoquinone.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation et ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine et, l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques est la biotine. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) se caractérise en ce que le domaine de translocation et la molécule de liaison aux acides nucléiques forment une protéine de fusion. Par protéine de fusion, on entend désigner une protéine qui renferme des domaines protéiques provenant de protéines différentes et codées par une même molécule d'ADN obtenue par la technologie de l'ADN recombinant. Cette protéine de fusion et l'anticorps sont liés à une molécule de type avidine aux moyens d'agents de pontage qui sont identiques ou différents, ladite protéine de fusion étant liée à ladite

molécule d'acide nucléique par son domaine de liaison aux acides nucléiques.

Selon un autre mode préféré de réalisation, le conjugué précédemment décrit selon un autre mode de réalisation (C) de l'invention est caractérisé en ce que en ce que l'agent de pontage qui lie ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine, et l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone.

Selon un autre mode préféré de réalisation, le conjugué précédemment décrit selon un autre mode de réalisation de l'invention (C) est caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la biotine.

Le conjugué selon l'invention se caractérise en ce que la molécule d'acide nucléique du conjugué est choisie parmi l'ADN simple brin, l'ADN double brin, l'ARN simple brin, l'ARN double brin, l'hybride ARN/ADN. Selon un mode préféré de réalisation, ladite molécule d'acide nucléique est de l'ADN double brin ou de l'ARN simple brin qui code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule. Les produits protéiques d'intérêt sont choisis dans un groupe composé des interleukines, des cytokines, des lymphokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des protéines tueuses, des protéines qui permettent de lever la chimiorésistance et des enzymes de restriction ; les interleukines, cytokines et lymphokines sont choisies dans un groupe composé de préférence des interleukines Il-1, Il-2, Il-3, Il-4, Il-5, Il-6, Il-7, Il-8, Il-9, Il-10, Il-11, Il-12, Il-13, Il-14, Il-15, Il-16, Il-17 et Il-18, des interférons α -IFN, β -IFN et γ -IFN ; de préférence le produit protéique d'intérêt est l'interleukine 2. Les facteurs de croissance sont de préférence les facteurs stimulateurs des colonies (colony stimulating factors) G-CSF, GM-CSF, M-CSF) et l'érythropoïétine, il convient également de citer les facteurs de croissance qui interagissent en les inhibant, avec les facteurs de transcription nucléaires tels NF-KB ; ces facteurs de croissance ont fait

l'objet de la demande de brevet FR 98 14858. Les protéines tueuses sont choisies parmi le groupe composé des kinases, et de préférence la thymidine kinase, et des protéines pro-apoptotiques ; on entend désigner par protéines pro-apoptotiques les protéines qui interviennent dans l'apoptose ou promeuvent l'apoptose. Parmi les protéines pro-apoptotiques, il convient de citer les protéines de la famille de Bcl2, et plus particulièrement les protéines BIK (Bcl2-interacting protein), BAX (Oltvai *et al.* 1993, Cell 74 :609-619), BAK (Chittenden *et al.* 1995, Nature 374 : 733-736 ; Kiefer *et al.* 1995, Nature 374 : 736-739) et BID (BH3-interacting domain death agonist) (Wang *et al.* 1996, Genes Dev. 10 : 2859-2869); de préférence le produit protéique d'intérêt est la protéine BAX. Parmi les protéines pro-apoptotiques, il convient également de citer les caspases, la protéine AIF (apoptosis-inducing factor) (Susin *et al.* 1999, Nature 397 : 441-446) et les protéines de la famille du facteur nécrosant des tumeurs (TNF, tumor necrosing factor), et plus particulièrement le TNF lui-même (Old 1985, Science 230 : 630-632), la protéine FASL (FAS-ligand) (Takahashi *et al.* 1994, Int. Immun. 6 :1567-1574).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la molécule d'acide nucléique est un ARN antisens.

Selon l'invention, le conjugué selon l'invention se caractérise en ce que la molécule de liaison aux acides nucléiques lie ladite molécule d'acide nucléique par une liaison non-covalente. La molécule de liaison aux acides nucléiques est soit un polymère polycationique soit une protéine de liaison aux acides nucléiques : (i) le polymère polycationique est choisi parmi la poly-L-lysine, la poly-D-lysine, le polyéthylénimine, la polyamidoamine, la polyamine ; de préférence, le polymère polycationique est la poly-L-lysine ; (ii) la protéine de liaison aux acides nucléiques est choisie parmi les histones, l'ornithine, la putrescine, la spermidine, la spermine, les facteurs de transcription, les protéines

homéobox ; de préférence, la protéine de liaison aux acides nucléiques est une histone.

Le conjugué selon l'invention se caractérise en ce que ledit domaine de translocation dérive d'une toxine bactérienne ou virale sans contenir 5 la partie de la toxine qui lui confère son effet毒ique. La toxine bactérienne ou virale est choisie parmi : l'exotoxine A de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique, la toxine cholérique, la toxine anthrox de *Bacillus*, la toxine Pertussis, la toxine Shiga de *Shigella*, la toxine apparentée à la toxine Shiga, les toxines d'*Escherichia coli*, la colicine A, la d- 10 endotoxine, l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*. Dans un mode préféré de réalisation, le domaine de translocation est l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un autre mode préféré de réalisation, le domaine de translocation est le fragment B non toxique de la toxine Shiga de *Shigella*. Dans un autre mode préféré de réalisation, le 15 domaine de translocation est un fragment de l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*.

Le conjugué selon l'invention est caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal spécifique d'un antigène de surface membranaire. Selon un des modes préférés de 20 réalisation de l'invention, l'anticorps se lie spécifiquement à l'antigène G250 caractéristique des carcinomes des cellules rénales humaines (RCC). Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'anticorps de l'invention est l'anticorps G250 décrit par Oosterwijk *et al.* (1986, Int. J. Cancer. 38 :489-494) et qui a fait l'objet de la demande de brevet 25 internationale WO 88/08854. Selon un autre mode préféré de réalisation, l'anticorps selon la présente invention est un anticorps monoclonal 5C5 obtenu par l'hybridome 5C5 déposé à la CNCM sous le N°I-2184. L'anticorps selon l'invention est soit sous la forme d'un anticorps simple chaîne, soit sous la forme d'un anticorps chimérique 30 ou d'un anticorps humanisé. Selon un mode particulier de réalisation,

l'anticorps est un fragment d'anticorps, de préférence un fragment F(ab')2 ou Fab'.

Le conjugué ADN-anticorps de la présente invention peut être administré selon diverses voies connues par les personnes de l'art. Par exemple, il peut être administré par voie intraveineuse, par voie intrapéritonéale, par voie intramusculaire, par voie sous-cutanée, par voie intra-tumorale, par voie anale ou rectale.

Enfin, l'invention porte sur un conjugué tel que décrit précédemment à titre de médicament. Plus particulièrement, l'invention porte sur un conjugué tel que décrit précédemment à titre de médicament pour la thérapie génique et plus précisément pour le traitement des maladies génétiques acquises ou constitutionnelles. Selon l'invention, les maladies acquises sont sélectionnées dans le groupe composé des cancers et des maladies infectieuses. Parmi les cancers selon l'invention, on peut citer, le carcinome des cellules rénales (RCC), le mélanome, la leucémie myéloïde chronique, la leucémie myéloïde aiguë, le lymphome de Burkitt, le cancer pulmonaire à petites cellules, le neuroblastome, le rétinoblastome, le glioblastome, l'hépatocarcinome, rhabdomyosarcome, l'adénocarcinome gastrique, le carcinome colique, le cancer ovarien, le carcinome mammaire, le cancer de l'utérus, le carcinome du testicule. De préférence, l'invention porte sur un conjugué tel que décrit précédemment à titre de médicament pour le traitement du carcinome des cellules rénales (RCC). Parmi les maladies infectieuses on peut citer de préférence le SIDA et les hépatites.

Selon l'invention, les maladies constitutionnelles sont sélectionnées de préférence dans le groupe composé des myopathies, et plus particulièrement de la myopathie de Duchenne (DM), la myopathie de Steinert et l'amyotrophie spinale (SMA), la mucoviscidose, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), l'hémophilie, les hémoglobinopathies, les maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la chorée de Huntington, la maladie de Gaucher, la

maladie de Lesch-Nyhan, les déficiences immunitaires liées à un déficit en adénosine désaminase ou en purine nucléoside phosphorylase, l'emphysème pulmonaire, l'hypercholestérolémie.

Il est évident que le composé selon l'invention a de multiples applications selon la nature de la séquence d'ADN et de la nature de l'anticorps sélectionnés. Ces multiples applications sont facilement envisageables par une personne de l'art et ne peuvent être mentionnées de manière exhaustive.

L'invention porte également sur une composition pharmaceutique notamment pour le traitement des maladies par thérapie génique qui comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un conjugué selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention porte également sur un procédé de transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule, caractérisé en ce qu'on met en contact avec ladite cellule le conjugué selon l'invention de façon à transfecter ladite cellule avec ledit conjugué. De préférence, la molécule d'acide nucléique code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule transfectée.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la molécule d'acide nucléique est de l'ADN double brin codant pour un produit protéique d'intérêt. La présente invention fournit donc un système efficace qui permet le transit de la molécule d'ADN double brin à travers la membrane cellulaire cytoplasmique, le transport vers le noyau, l'entrée dans le noyau et le maintien à l'état fonctionnel de cette molécule dans le noyau. La persistance de l'expression du produit protéique codé par la molécule d'ADN est obtenue soit par l'intégration stable de la molécule d'ADN dans l'ADN chromosomique de la cellule cible, soit par maintien de la molécule d'ADN sous la forme d'un réplicon extrachromosomique. C'est donc un des objets de la présente invention de fournir un procédé caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique se maintient sous la forme d'un réplicon

extrachromosomique dans ladite cellule. Selon un autre mode de réalisation, la présente invention fournit un procédé caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique s'intègre dans l'ADN génomique et/ou mitochondrial de ladite cellule transfectée.

5 La cellule ciblée par le composé de la présente invention est une cellule procaryote ou eucaryote, animale ou végétale. Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne un procédé caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote, de préférence une cellule de mammifère, et de manière préférée une cellule humaine.

10 Enfin, l'invention concerne les cellules transfectées par le conjugué selon l'invention ; la cellule étant de préférence une cellule eucaryote, plus particulièrement de mammifère, et de manière préférée humaine.

15 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

20 **Figure N°1 :** Production d'interleukine 2 murine par des lignées RCC antifectées par le conjugué G250/BZQ/IIL2 (G250=DNA) en présence ou non d'exotoxine A.

Figure N°2 : Production d'interleukine 2 murine par des lignées RCC antifectées par les conjugués G250-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IIL2 (G250AvPL) et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IIL2 (G250AvPLTox) ; contrôle négatif : avidine/BZQ/PL/IIL2 (AvPL).

25

EXEMPLES

30 **EXAMPLE 1 : MATERIELS ET METHODES** (voir Dürrbach *et al.*, The antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal-cell-carcinoma *in vitro*, Cancer Gene Therapy, Sous Presse)

1.1. Cellules

Les lignées cellulaires de carcinome rénal utilisées sont : IGR/RCC-17 (HIEG), IGR/RCC-40 (ROB), IGR/RCC-47 (FRAP), 5 IGR/RCC-58 (MOJ) qui dérivent de trois tumeurs primaires (-17, -40 et -47) et d'une métastase surrénale (-58), de quatre patients atteints de RCC au stade métastatique. Selon les critères histologiques, le RCC-17, -40 et -58 correspondent à des carcinomes à cellules claires et le RCC-47 à une forme particulière de carcinome à cellules claires avec des foci 10 papillaires typiques hautement tumorigéniques chez la souris SCID (Angevin *et al.* (1997) Proc. Am. Asso. Cancer Res. 38 : 238 ; Goulkhova *et al.* (1998) Genes Chrom. Cancer 22 :171-178). L'établissement de la culture *in vitro* ainsi que la caractérisation des lignées cellulaires de RCC ont été réalisées comme précédemment décrit (Angevin *et al.* (1997 15 Int. J. Cancer 72 :434-440). Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère comportant 5% de CO₂ dans du milieu MEM modifié par Dulbecco avec du Glutamax-1 (Gibco BRL, Paisley, Scotland) supplémenté avec 10% de sérum de veau fétal (Seromed, Berlin, Allemagne), 5% d'acides aminés non-essentiels, 10 mM de pyruvate de 20 sodium (Gibco BRL) et un mélange de pénicilline/streptomycine (10mg/ml) (Seromed).

1.2. Immunophénotypage de l'antigène G250

L'expression de l'antigène G250 associé aux tumeurs RCC a été 25 directement testée par immunomarquage indirect en utilisant l'anticorps monoclonal IgG1 G250 (mAb G250) de souris précédemment décrit (Oosterwijk *et al.*, 1986, Int. J. Cancer. 38 :489-494). Une suspension de 5.10⁵ cellules, obtenues par trypsination, a été lavée deux fois dans du milieu de culture des RCC ; les cellules sont ensuite 30 incubées avec le mAb G250, lavées 3 fois dans du PBS (Phosphate-buffered saline), puis incubées avec un fragment F(ab')2 d'anticorps IgG

de chèvre anti-souris marqué au FITC. L'anticorps monoclonal NKTA ayant le même isotype (IgG1 dirigé contre un déterminant clonotypique du TCR α/β) (fourni gracieusement par le Docteur Thierry Hercend, France) a été utilisé comme contrôle négatif. La cytométrie de flux a été réalisée avec un cytomètre FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) utilisant le logiciel Cellquest.

1.3. Expériences d'endocytose

L'anticorps G250 et l'apo-transferrine humaine chargée en fer (Sigma, St-Louis, MO, USA) ont été couplés respectivement avec de la fluorescéine isothiocyanate (Sigma) et avec du chlorure de sulfonyl Rhodamine B lissamine tel décrit précédemment (Maxfield *et al.*, 1978, Cell 14 :805-810 ; Brandzaeg, 1973, Scan. J. Immunol. 2 : 273-290). Les protéines conjuguées sont séparées des fluorochromes libres par gel filtration sur une colonne de Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). La liaison spécifique des protéines couplées avec les récepteurs cellulaires de surface a été déterminée par des expériences de compétition utilisant une concentration 100 fois supérieure de protéines non-couplées. L'ADN plasmidique BMGnéo-mIL2 contenant le cDNA de l'interleukine 2 de souris (IL-2) sous le contrôle du promoteur inductible du gène de la métallothionéine (Karasuyama et Melchers, 1988, Eur. J. Immunol. 18 : 97-104) (1 mg/ml) est incubé (vol/vol) avec EZ-link-Biotin-LC-ASA reconstitué dans l'éthanol (2 mg/ml) (Pierce, Rockford, IL, USA) et exposé pendant 15 min aux UV (365 nm) à 4°C. L'ADN plasmidique est ensuite précipité à l'éthanol (concentration finale 70%) pendant 30 min à -20°C. L'efficacité du marquage est déterminée par un test ELISA sur des microplaques couvertes de poly-L-lysine en utilisant de la phosphatase-alkaline conjuguée à de la streptavidine.

Pour tester l'endocytose, les cellules cultivées deux jours sur des lamelles sont lavées trois fois avec du RPMI-1640 (Gibco BRL) contenant 1 mg/ml de sérum albumine bovine (BSA), puis sont

incubées deux fois 15 min dans du RPMI-1640 contenant 1 mg/ml de BSA à 37°C avec ou sans cytochalasine D (5 µM) (Sigma). Les cellules sont ensuite incubées une heure à 4°C avec de la transferrine conjuguée à la rhodamine (50 nM) et de l'anticorps monoclonal G250 marqué au FITC dans du RPMI-1640 contenant 1 mg/ml de BSA avec ou sans cytochalasine D (5 µM) puis transférées à 37°C pendant des temps variables avec de la transferrine-Rhodamine seulement (pulse) ou avec le mAb G250 marqué au FITC. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS froid, fixées 20 min avec une solution de paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0.025% dans du PBS à 4°C et préparées pour l'analyse en épifluorescence. Pour analyser la distribution du conjugué mAb G250-plasmide par double marquage, les cellules ont été incubées en permanence comme décrit ci-dessus soit avec du mAb G250 marqué au FITC conjugué avec de l'ADN plasmidique biotinylé ou soit avec un mélange de mAb G250 marqué au FITC et de l'ADN plasmidique biotinylé, comme contrôle.

Après fixation, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS, incubées 10 min avec 0,1% de borohydrate de sodium dans du PBS (ICN, Costa Mesa, CA, USA) et puis 10 min avec du chlorure d'ammonium (50 mM dans du PBS) (Sigma). Selon les conditions expérimentales, les cellules sont soit directement analysées par immunofluorescence pour détecter le mAb G250 marqué au FITC ou soit perméabilisées avec du PBS contenant 0,05% de saponine ou 0,1% de Triton X100 (ICN) puis marquées avec de la streptavidine conjuguée au Texas-red (20 mg/ml) (Pierce). Les filaments d'actine sont marqués avec de la phalloïdine-rhodamine selon les recommandations du fabricant (Sigma).

Les cellules sont ensuite visualisées avec un microscope Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany).

1.4. Antifection et analyse de l'expression hétérologue

Pour la transfection, 3.10^5 cellules de RCC fraîchement trypsinées sont incubées pendant 30 min à 4°C avec des concentrations différentes de conjugués mAb-ADN selon l'invention dans 1 ml de RPMI-1640 sans sérum. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures à 37°C
5 dans 1 ml de RPMI-1640 sans-sérum contenant 4.10^5 M de chloroquine (Sigma) et finalement resuspendues dans 2 ml de DMEM supplémenté avec du glutamax-1 (Gibco BRL) et 10% de sérum de veau fétal. Dans des expériences séparées, les cellules de RCC sont incubées avec l'ADNc d'IL-2 de souris conjugué au mAb G250 en présence de cytochalasine D
10 pendant 1 heure à 4°C et 4 heures à 37°C. Les conjugués toujours liés à la surface cellulaire ont été décrochés avec une solution de RPMI-1640 pH 2,2 contenant de la glycine 0,1M pendant 2 min à 4°C. Deux volumes de RPMI-1640 pH 9,0 sont ensuite ajoutés pendant 3 min et les cellules sont incubées dans un milieu de culture normal. Pour
15 déterminer la production d'interleukine 2 murine, 100 µl de surnageants de culture de cellules ont été prélevés à des jours différents après la transfection. La production de cytokine dans le milieu a été déterminée en utilisant le kit ELISA DuoSeT spécifique de l'IL-2 de souris (Réf. 80-3573-00) (seuil de détection de 15 pg/ml) (Genzyme
20 Diagnostics, Cambridge, MA, USA)

EXAMPLE 2 : Conjugués G250/BZQ/Il2 et G250/BZQ/Il2+ExoT

2.1. Préparation du conjugué G250/BZQ/Il2

Le conjugué G250/BZQ/Il2 est préparé par couplage entre l'anticorps monoclonal G250 et un plasmide codant pour l'interleukine 2 murine (mIl-2) au moyen de la benzoquinone (BZQ) selon la méthode de couplage précédemment décrite par Poncet *et al.* (1996, Gene Therapy 3 : 731-738).

La BZQ dissoute dans de l'éthanol absolu à une concentration de 30 mg/ml est ajoutée à une solution d'anticorps monoclonal purifié en solution dans du PBS à une concentration d'au moins 2 mg/ml pour donner une solution finale contenant 3 mg/ml de BZQ. 1/10 du volume final est ensuite ajouté sous la forme de tampon de phosphate de potassium 1M pH 6.0. Après 90 min. à température ambiante, dans l'obscurité, l'anticorps monoclonal activé est séparé de l'excès de BZQ par chromatographie sur une colonne G25M (Pharmacia) présaturée en 1% BSA dans du NaCl 0,15M, collecté puis mélangé avec l'ADN plasmidique purifié (10 fois la quantité d'anticorps). La solution est mélangée avec 0.1 M de tampon carbonate pH 8,7 et incubée 48 heures à 4°C. Le conjugué mAb-ADN est concentré par filtration sur gel sur une colonne FPLC Superose 6HR (Pharmacia) pour éliminer les excès d'anticorps libre susceptibles d'entrer en compétition avec le conjugué ADN-anticorps. Les fractions collectées sont dialysées contre du PBS et concentrées en utilisant une cartouche Centricon 10 (Amicon, MA, USA). Les quantités de conjugués solubles purifiés sont exprimées comme la quantité d'ADN plasmidique initialement utilisée dans la réaction.

20

2.2. Antifection de lignées RCC avec les conjugués G250/BZQ/Il2 et G250/BZQ/Il2+ExoT

Nous avons comparé la mesure d'Il-2 après transfert de ce conjugué dans des lignées RCC après addition ou non d'exotoxine A (ExoT) de *Pseudomonas Aeruginosa* dans le milieu de culture. L'exotoxine A commercialisée par Sigma est ajoutée au conjugué G250/BZQ/Il2.

Les conjugués G250/BZQ/Il2 et G250/BZQ/Il2+ExoT sont mis en contact avec 10^5 cellules de lignées RCC en culture dans un milieu dépourvu en sérum pendant 4 heures à 37°C selon le protocole préalablement décrit. Les cellules sont remises en culture en milieu

normal après lavages. La production d'IL-2 est mesurée 10 jours plus tard en utilisant le kit ELISA DuoSeT (Réf. 80-3573-00, Genzyme Diagnostics).

Les cellules antifectées avec le conjugué G250/BZQ/IL2+ExoT 5 produisent environ 3 fois plus d'IL-2 murine ($371 \text{ pg}/10^6$ cellules) que les cellules antifectées par le conjugué G250/BZQ/IL2 ($165 \text{ pg}/10^6$ cellules) (Figure N°1).

10 **EXEMPLE 3 : Conjugués G250-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2 et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2**

3.1. Préparation des conjugués

Le corps central des conjugués G250-15 Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2 et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2 se compose d'une molécule tétravalente d'avidine (Av) qui est dans un premier temps activée par la benzoquinone selon le protocole précédemment décrit. L'avidine activée lie les molécules de poly-L-lysine qui sont des molécules très affines 20 pour l'ADN. Le complexe Avidine/BZQ/PL est mis en contact avec le plasmide codant l'interleukine 2 de souris (IL-2). Le complexe est ensuite associé à l'anticorps monoclonal G250 et/ou à l'exotoxine A (ExoT) tous deux préalablement biotinylés.

25 **3.2. Antifection de lignées RCC avec les conjugués G250-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2 et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2**

Les différents complexes sont mis en contact avec 10^5 cellules de lignées RCC en culture dans un milieu dépourvu en sérum pendant 4 heures à 37°C selon le protocole préalablement décrit. Les cellules sont 30 remises en culture en milieu normal après lavages. La production d'IL-2

est mesurée 10 jours plus tard en utilisant le kit ELISA DuoSeT (Réf. 80-3573-00, Genzyme Diagnostics).

Les résultats sont présentés dans la figure N°2. Dans l'expérience contrôle dans laquelle l'anticorps monoclonal G250 a été omis, une 5 certaine production de mIl-2 est mesurée (127 pg/10⁶ cellules, AvPL) due certainement à l'accrochage non spécifique des molécules de poly-L-lysine et/ou d'avidine à la surface des cellules. L'addition de mAb G250 au complexe avidine/BZQ/PL/Il2 augmente de 2 fois la production d'interleukine 2 murine (261 pg/10⁶ cellules au lieu de 127 10 pg/10⁶ cellules); la présence supplémentaire d'exotoxine A (ExoT) permet d'augmenter de 10 fois la production de mIl-2 (1347 pg/10⁶ cellules) (Figure N°2).

REFERENCES

- Angevin *et al.* 1997, Proc. Am. Asso. Cancer Res. 38 : 238.
5 Angevin *et al.* 1997, Int. J. Cancer 72 :434.
Brandzaeg 1973, Scan. J. Immunol. 2 : 273.
Chittenden *et al.* 1995, Nature 374 : 733
Cournoyer *et al.* 1991, Human Gene Therapy, 2 : 203.
Dürrbach *et al.* (Sous Presse) Cancer Gene Therapy.
10 Fominaya et Wels 1995, J. Biol. Chem. 271 :10560.
Golumbek *et al.* 1991, Science 254 :713.
Goulkhova *et al.* 1998, Genes Chrom. Cancer 22 :171.
Hirsch *et al.* 1993, Transpl. Proc. 25 : 138.
Karasuyama et Melchers 1988, Eur. J. Immunol. 18 : 97.
15 Kasahara *et al.* 1987, J. Biol. Chem. 262 :4429.
Kiefer *et al.* 1995, Nature 374 : 736
Luthman *et al.* 1983, Nucleic Acids Res. 11 : 1295.
Maxfield *et al.* 1978, Cell 14 :805.
Michael et Curiel 1994, Gene Therapy 1:223.
. 20 Neda *et al.* 1991, J. Biol. Chem. 266 : 14143.
Old 1985, Science 230 : 630
Oltvai *et al.* 1993, Cell 74 :609
Oosterwijk *et al.* 1986, Int. J. Cancer. 38 :489.
Poncet *et al.* 1996, Gene Therapy 3 : 731.
25 Ragot *et al.* 1993, Nature 361 : 647.
Rosenberg *et al.* 1990, N. Eng. J. Med. 323 :570.
Roux *et al.* 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86 :9079.
Susin *et al.* 1999, Nature 397 : 441
Takahashi *et al.* 1994, Int. Immun. 6 :1567
30 Wang *et al.* 1996, Genes Dev. 10 : 2859
Wu *et al.* 1991, J. Biol. Chem. 266 :14338.

Zenke et al. 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 87 :3655.

REVENDICATIONS

- 5 1. Conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un domaine de translocation et un anticorps spécifique d'un antigène de surface de ladite cellule, tel que ledit conjugué est transfété efficacement dans ladite cellule.

10 2. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce que lesdits molécule d'acide nucléique, domaine de translocation et anticorps sont conjugués au moyen d'au moins un agent de pontage.

15 3. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une molécule de liaison aux acides nucléiques, tel que ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique.

20 4. Conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et une molécule de liaison aux acides nucléiques tel que ledit conjugué est transfété efficacement dans ladite cellule.

25 5. Conjugué selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont liés à une molécule de type

avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique.

- 5 6. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 2, 3 et 5 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la benzoquinone et/ou la biotine.
- 10 7. Conjugué selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la benzoquinone.
- 15 8. Conjugué selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation et ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine et, l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone.
- 20 9. Conjugué selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques est la biotine.
10. Conjugué selon les revendications 3 et 9 caractérisé en ce que le domaine de translocation et la molécule de liaison aux acides nucléiques forment une protéine de fusion.
- 25 11. Conjugué selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine, et l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone.

12. Conjugué selon la revendication 5 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la biotine.
13. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique est choisie parmi l'ADN simple brin, l'ADN double brin, l'ARN simple brin, l'ARN double brin, l'hybride ARN/ADN.
14. Conjugué selon la revendication 13 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique est de l'ADN double brin ou de l'ARN simple brin qui code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule.
15. Conjugué selon la revendication 14 caractérisé en ce que ledit produit protéique d'intérêt est choisi dans un groupe composé des interleukines, des cytokines, des lymphokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des gènes tueurs, des gènes qui permettent de lever la chimiorésistance, des enzymes de restriction.
- 20 16. Conjugué selon la revendication 15 caractérisé en ce que le produit protéique d'intérêt est l'interleukine 2.
- 25 17. Conjugué selon la revendication 15 caractérisé en ce que le produit protéique d'intérêt est la protéine Bax.
18. Conjugué selon la revendication 13 caractérisée en ce que ladite molécule d'acide nucléique est un ARN antisens.
- 30 19. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 3 à 18 caractérisé en ce que la molécule de liaison aux acides nucléiques lie ladite molécule d'acide nucléique par une liaison non-covalente.

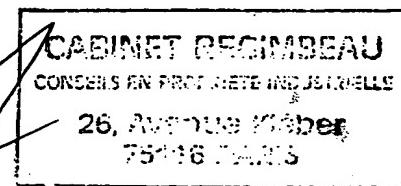
20. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 3 à 19 caractérisé en ce que la molécule de liaison aux acides nucléiques est un polymère polycationique ou une protéine de liaison aux acides nucléiques.
- 5
21. Conjugué selon la revendication 20 caractérisé en ce que ledit polymère polycationique est choisi parmi la poly-L-lysine, la poly-D-lysine, le polyéthylénimine, la polyamidoamine, la polyamine.
- 10
22. Conjugué selon la revendication 21 caractérisé en ce que ledit polymère polycationique est la poly-L-lysine.
- 15
23. Conjugué selon la revendication 20 caractérisé en ce que la protéine de liaison aux acides nucléiques est choisie parmi les histones, l'ornithine, la putrescine, la spermidine, la spermine, les facteurs de transcription, les protéines homéobox.
- 20
24. Conjugué selon la revendication 23 caractérisé en ce que ladite protéine de liaison aux acides nucléiques est une histone.
- 25
25. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 8 à 10 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation dérive d'une toxine bactérienne ou virale sans contenir la partie de la toxine qui lui confère son effet toxique.
- 30
26. Conjugué selon la revendication 25 caractérisé en ce que ladite toxine bactérienne ou virale est choisie parmi: l'exotoxine A de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique, la toxine cholérique, la toxine anthrox de *Bacillus*, la toxine Pertussis, la toxine Shiga de *Shigella*,

la toxine apparentée à la toxine Shiga, les toxines d'*Escherichia coli*, la colicine A, la d-endotoxine, l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*.

27. Conjugué selon la revendication 26 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation est l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*.
28. Conjugué selon la revendication 26 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation est le fragment B non toxique de la toxine Shiga de *Shigella*.
29. Conjugué selon la revendication 26 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation est un fragment de l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*.
30. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 29 caractérisé en ce que ledit anticorps est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal.
31. Conjugué selon la revendication 30 caractérisé en ce que ledit anticorps est spécifique d'un antigène de surface membranaire.
32. Conjugué selon la revendication 31 caractérisé en ce que ledit antigène est l'antigène G250.
33. Conjugué selon la revendication 31 caractérisé en ce que ledit anticorps est l'anticorps monoclonal 5C5 obtenu par l'hybridome 5C5 déposé à la CNCM sous le N° I-2184.
34. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 33 à titre de médicament.

35. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 33 à titre de médicament pour la thérapie génique.
- 5 36. Conjugué selon la revendication 35 à titre de médicament pour le traitement des maladies génétiques acquises ou constitutionnelles.
- 10 37. Conjugué selon la revendication 36 à titre de médicament pour le traitement des maladies génétiques acquises choisies parmi les cancers et les maladies infectieuses.
- 15 38. Conjugué selon la revendication 37 à titre de médicament pour le traitement du carcinome des cellules rénales (RCC).
- 20 39. Composition pharmaceutique notamment pour le traitement des maladies par thérapie génique qui comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 33 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 25 40. Procédé de transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'on met en contact avec ladite cellule un conjugué selon l'une des revendications 1 à 38 de façon à transfecter ladite cellule avec ledit conjugué.
41. Procédé selon la revendication 40 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule transfectée.

42. Procédé selon la revendication 40 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique se maintient sous la forme d'un réplicon extrachromosomique dans ladite cellule.
- 5 43. Procédé selon la revendication 40 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique s'intègre dans l'ADN génomique et/ou mitochondrial de ladite cellule transfectée.
- 10 44. Procédé selon les revendications 40 à 43 caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote.
45. Cellule transfectée par un conjugué selon l'une des revendications 1 à 38.
- 15 46. Cellule selon la revendication 45 caractérisée en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote, plus particulièrement de mammifère, et de manière préférée humaine.

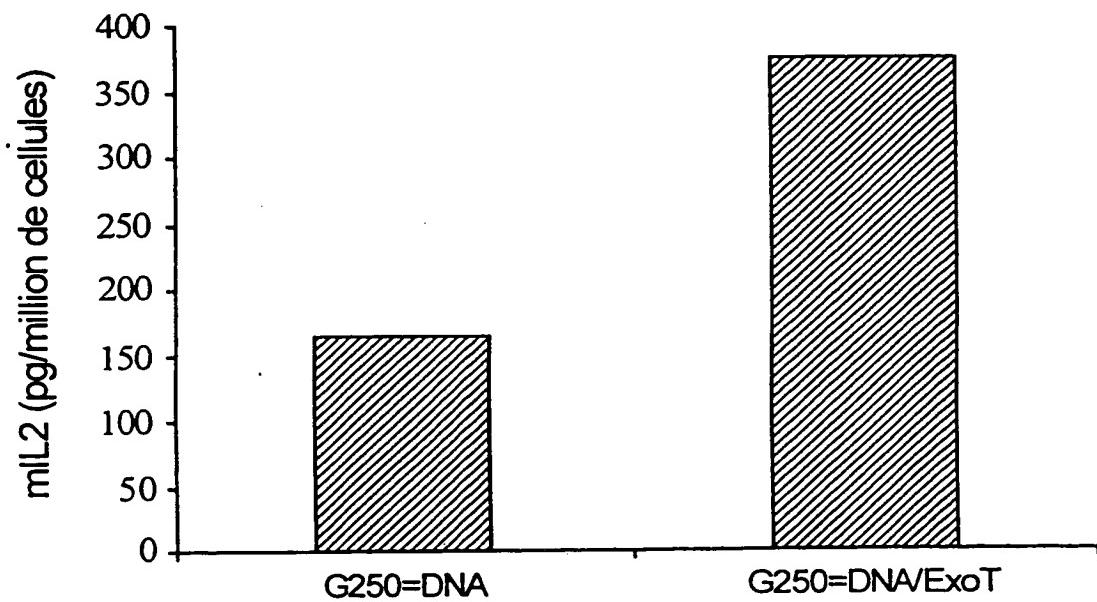


35. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 33 à titre de médicament pour la thérapie génique.
- 5 36. Conjugué selon la revendication 35 à titre de médicament pour le traitement des maladies génétiques acquises ou constitutionnelles.
- 10 37. Conjugué selon la revendication 36 à titre de médicament pour le traitement des maladies génétiques acquises choisies parmi les cancers et les maladies infectieuses.
- 15 38. Conjugué selon la revendication 37 à titre de médicament pour le traitement du carcinome des cellules rénales (RCC).
- 20 39. Composition pharmaceutique notamment pour le traitement des maladies par thérapie génique qui comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 33 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 25 40. Cellule transfectée par un conjugué selon l'une des revendications 1 à 33.
41. Cellule selon la revendication 40, caractérisée en ce qu'elle comprend ladite molécule d'acide nucléique dudit conjugué sous la forme d'un réplicon extrachromosomique.
- 25 42. Cellule selon la revendication 40, caractérisée en ce que ladite molécule d'acide nucléique dudit conjugué est intégrée dans l'ADN génomique et/ou mitochondrial de ladite cellule transfectée.

43. Cellule selon l'une quelconque des revendications 40 à 42, caractérisée en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote, plus particulièrement de mammifère, et de manière préférée humaine.

1 / 2

Production de mIL2 après antifection



FIG_1

Production de mIL2 après antifection

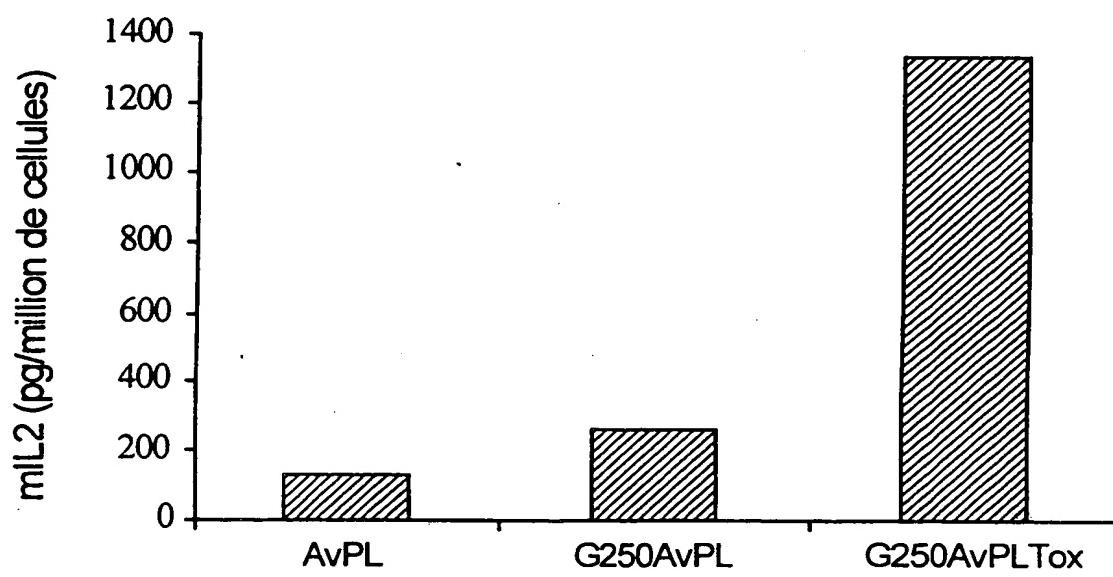


FIG. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)